

Cdt1によるDNA複製の抑制に関する解析

著者	牛田 磨理
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/49588

修士論文

Cdt1 による DNA 複製の抑制に関する解析

東北大学大学院薬学研究科 修士課程

生命薬学専攻 遺伝子薬学分野

牛田磨理

目次

第1章 要旨	1
第2章 序論	3
第1節 細胞周期	3
第2節 DNA複製ライセンス化機構	4
第3節 チェックポイント機構	10
第4節 アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞実験系	12
第5節 本研究の目的	14
第3章 結果	15
第1節 Cdt1 組換えタンパク質の添加による DNA 複製の抑制	15
第2節 Cdt1 による DNA 複製の抑制とチェックポイント機構	18
第3節 Mcm2-7 複合体結合領域に変異を加えた組換え Cdt1 による DNA 複製	20
第4節 N 末を欠損した組換え Cdt1 による DNA 複製	23
第4章 考察	27
第1節 GST-Cdt1 添加によって引き起こされる DNA 複製の阻害は Mcm2-7 複合体を介して誘導される。	27
第2節 GST-Cdt1 による新生鎖 DNA 伸長反応の阻害には DNA 結合領域を含む N 末端側も必要である。	29
第3節 今後の展望	30
第5章 実験材料及び実験方法	32
謝辞	48
参考文献	49

第1章 要旨

[背景]

真核細胞には DNA を一回の細胞周期で一度のみ複製するための制御機構として DNA 複製ライセンス化反応が存在する。この反応は複製開始点に複製開始点認識複合体 (origin recognition complex; ORC) が結合することで始まる。この ORC の結合に依存して Cdc6、Cdt1 がクロマチン上に結合し、これらの介在により DNA 複製の開始に必要な Mcm2-7 複合体がクロマチン上に導入される。geminin は Cdt1 と結合し、その活性を抑制することでライセンス化反応を阻害するタンパク質である。また、Cdt1 は細胞周期に依存して分解を受けており、geminin による阻害とともにその活性を厳密に調節されている。実際に Cdt1 を過剰発現させると DNA の再複製が誘導されることや、癌細胞において Cdt1 の発現が亢進していることが知られており、Cdt1 の活性の調節が DNA 複製の制御やゲノム安定性の維持に重要な役割を果たす可能性が示されている。そこで本研究では過剰な Cdt1 がもたらす現象とそれに対する制御機構について、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系を用いて検討した。

[結果・考察]

これまでに当研究室において、卵抽出液を用いた無細胞 DNA 複製実験系に GST を融合させた組換え Cdt1 タンパク質 (GST-Cdt1) を添加することにより、チェックポイント機構を活性化する異常な DNA 複製が誘導されることに加え、DNA 複製における新生鎖 DNA 伸長反応がチェックポイント機構非依存的に抑制されることが示された。そこで、本研究ではこの DNA 複製の抑制についてさらに解析を進めた。

新生鎖 DNA は、鋳型鎖が DNA helicase によって一本鎖 DNA に開裂したのちに DNA polymerase によって伸長される。そこで、どの段階で新生鎖伸長反応が Cdt1 により抑

制されるのかを確認するために、GST-Cdt1 により DNA 複製を抑制したときの一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体 (RPA) のクロマチン結合について検討したが、DNA polymerase の阻害剤である aphidicolin を加えた場合とは異なり、RPA はクロマチン上に蓄積しなかった。さらに、一本鎖 DNA の露出に応じた DNA 複製チェックポイントの活性化を調べるために Chk1 のリン酸化状態について検討した。その結果、新たな DNA 複製開始を抑制した条件では GST-Cdt1 を加えたときの Chk1 のリン酸化は観察されなかった。以上より、S 期に過剰な Cdt1 が存在するとき、Cdt1 は DNA helicase を阻害することによって新生鎖伸長反応を抑制しており、このため一本鎖 DNA の過度の露出は進行せず、DNA 複製チェックポイントも活性化されないものと考えられた。そこで、DNA helicase である Mcm2-7 複合体との結合領域に種々の変異を加えた組換え Cdt1 を複数種作製し、同様の検討をおこなった。その結果、これらの組換え Cdt1 ではライセンス化活性と相関して DNA 複製阻害効果が減弱した。したがって、Cdt1 による DNA 複製の阻害には Cdt1 と Mcm2-7 複合体との結合が必要であると推察された。

次に、Cdt1 の N 末を欠いた変異体 (239-620 a.a. ; GST-Cdt1-ΔN) を卵抽出液に添加したところ、この欠失変異体に十分なライセンス化活性があるにもかかわらず新生鎖伸長反応の阻害は認められなかった。Cdt1 の N 末には DNA 結合領域が存在するため、Cdt1 による新生鎖伸長反応の阻害には Cdt1 と DNA との結合も関与している可能性がある。

以上より、過剰な Cdt1 は DNA helicase である Mcm2-7 複合体と結合することで複製フォークの進行を抑制し、結果的に新生鎖伸長反応を阻害すると考えられた。さらに、Cdt1 と DNA の結合も新生鎖伸長反応の阻害に何らかの形で関与していることが推察された。発がん過程で Cdt1 の発現亢進が認められることから、本研究を基盤とする解析が今後さらに進展することにより、がん細胞と正常細胞の DNA 複製の違いについて新たな知見が得られることが期待される。

第2章 序論

第1節 細胞周期

生物の遺伝情報を担う DNA は、細胞分裂の際に正確にコピーされて二倍となった後、それぞれの娘細胞に分配される必要がある。このように細胞が分裂増殖する過程を細胞周期と呼ぶ。細胞周期において、細胞が分裂する時期を M 期 (mitosis)、DNA を複製する時期を S 期 (synthesis) と呼ぶ。またこれらの間に介在する二つのギャップ期を G1 期および G2 期と呼ぶ。細胞周期は G1 期→S 期→G2 期→M 期→G1 期…というように一方向性に回転する。細胞周期の進行は cyclin-cyclin dependent kinase (CDK) 複合体により制御され、この複合体により標的タンパク質がリン酸化されることで次のステージに進むことができる (Fig. 2-1)。cyclin の発現量は細胞周期依存的に変動する。一方、CDK の発現量は細胞周期を通じて一定であるが、リン酸化修飾などによってその活性が制御されることも知られる。また、cyclin-CDK 複合体に結合することで CDK のキナーゼ活性を阻害するたんぱく質として CDK inhibitor (CKI) が知られており、これらも細胞周期の制御に重要な役割を果たしている。

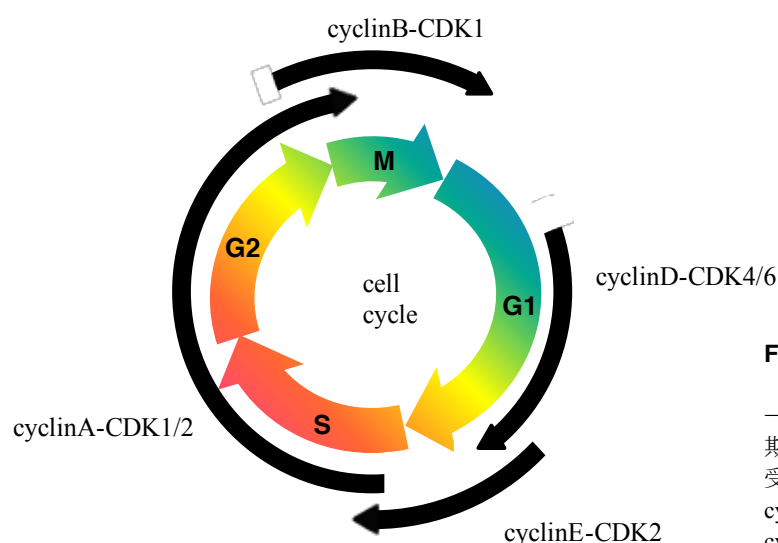


Fig.2-1 細胞周期

細胞周期は G1→S→G2→M→G1 の順に進行する。細胞周期の進行は CDK による制御を受けており、G1 期には cyclinD-CDK4/6、S 期開始には cyclinE-CDK2、S 期及び G2 期には cyclinA-CDK2、M 期には cyclinB-CDK1 が機能する。

細胞周期において最も重要なことは母細胞から娘細胞へ遺伝情報が正確に伝達されることである。そのため、ゲノム上のすべての領域が一回の細胞周期において一度だけ S 期にのみ複製されることが重要である。これを制御する機構として DNA 複製ライセンス化機構 (第 2 節)、やチェックポイント機構 (第 3 節) が存在する。

第 2 節 DNA 複製ライセンス化機構

真核細胞の遺伝情報は複数の染色体に担われており、それぞれの染色体には複数の複製開始起点 (origin) が存在する。M 期後期から G1 期初期の間に、これら origin に対して DNA 複製が一回の細胞周期において S 期で一度のみ起こるための制御機構として DNA 複製ライセンス化反応が存在する (Fig. 2-2)。

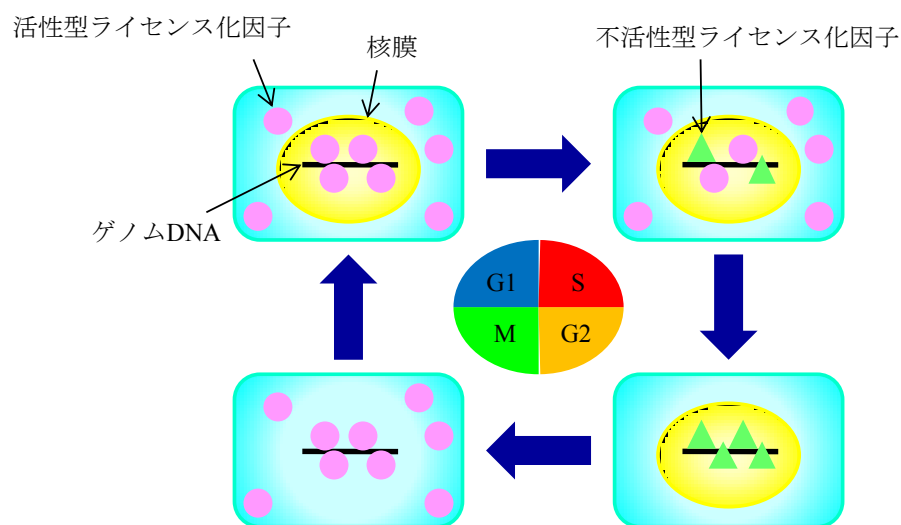


Fig. 2-2 DNA 複製ライセンス化仮説

ライセンス化仮説は1988年にアフリカツメガエル卵から調製した無細胞DNA複製系を用いて得られた実験をもとに提唱された。真核細胞では複製開始を許可するライセンス因子が存在し、染色体DNAに結合する。核内のライセンス化因子は複製開始によって不活性化されるが、M期を経ることによって核膜が崩壊すると再び染色体DNAに結合する

2.1 DNA 複製ライセンス化反応関連タンパク質

1) ORC (origin recognition complex)

ORC は、出芽酵母の自律複製配列 (autonomously replicating sequence: ARS) を特異的に認識して ATP 依存的に結合するタンパク質複合体として同定された (Bell and Stillman, 1992)。ORC は 6 つの subunit (Orc1~Orc6) で構成され、Orc1、Orc4、Orc5 は AAA⁺ ATPase family に共通の ATP 結合モチーフを持っている。origin への ORC の結合は ATP を必要とすることが知られている。また、すべての真核生物において構造的、機能的に保存されていることが明らかとなった (Gilbert, 2001)。

2) Cdc6 (cell division cycle 6)

Cdc6 (分裂酵母では Cdc18) は出芽酵母において細胞増殖に必須な因子として同定された (Grallert and Sipiczki, 1991; Lisiewicz *et al.*, 1988)。Cdc6 は AAA⁺ ATPase family に属し、Orc1 と高い相同性を示す。Walker A を介した ATP との結合により Cdc6 はクロマチンに結合し、Walker B による ATP 加水分解により Mcm2-7 複合体がクロマチン上に導入する (Tanaka *et al.*, 1997; Donovan *et al.*, 1997; Herbig *et al.*, 1999)。出芽酵母およびヒトにおいては、Orc1 との結合が報告されている (Saha *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999)。また、ORC-Cdc6 複合体がリング構造をとることが報告されており、Mcm2-7 複合体をクロマチン上へ導入する際の loader として機能すると考えられている (Speck *et al.*, 2005)。

分裂酵母において Cdc18 を高発現すると過度の複製を起こすことが明らかとなり、再複製を抑制するためにライセンス化因子の制御が重要であることが示唆されている (Nishitani and Nurse, 1995)。

3) Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1)

Cdt1 は分裂酵母において S 期に必要な遺伝子の転写にかかわる転写因子 Cdc10

のターゲットの一つとして同定された (Hofmann and Beach, 1994)。その後アフリカツメガエル卵抽出液を用いた実験系において、すでに同定されていたライセンス化因子である RLF-B と同一のものであることが明らかとなった (Tada *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 1995; Tada *et al.*, 1999)。Cdt1 を卵抽出液中から免疫除去すると Mcm2-7 複合体のクロマチンへの結合が起こらないことから、ライセンス化に必須であることが明らかとなった (Maiorano *et al.*, 2000)。さらに Cdt1 は Orc2 および Mcm2-7 複合体と結合することが報告されている。また、マウスにおいて DNA に直接結合することも報告されている (Yanagi *et al.*, 2002)

分裂酵母では Cdt1 の高発現が Cdc18 による DNA の過剰複製を増強し、哺乳類においては Cdt1 の過剰発現により DNA の再複製を起こす (Nishitani *et al.*, 2000; Vaziri *et al.*, 2003)。このため Cdt1 の制御が再複製の抑制に重要であると考えられている。高等真核生物では Cdt1 の分解に加え、geminin によっても制御されている。

4) Mcm (minichromosome maintenance) 2-7 複合体

出芽酵母において ARS を含むプラスミドを細胞内で安定的に維持するために必要な遺伝子群として *MCM* 遺伝子が単離され (Maine *et al.*, 1984)、後にこれらのうちの 6 種 (Mcm2~Mcm7) からなる Mcm2-7 複合体が真核細胞の DNA 複製に必須であることが明らかになった。6 分子は互いに結合して中央に穴の空いたリング構造を形成し、すべての subunit は ATP 結合ドメインを持つ。Mcm2-7 複合体は DNA 複製フォークとともに移動し (Aparicio *et al.*, 1997)、いずれかの Mcm subunit の欠損は DNA 複製フォークの停止を誘発することから (Labib *et al.*, 2000)、Mcm2-7 複合体は DNA 複製において鋳型 DNA を巻き戻す DNA helicase として機能すると考えられている。

2.2 DNA 複製ライセンス化反応

DNA 複製ライセンス化反応とはクロマチン上に複製前複合体 (pre-replication complex: pre-RC) を形成する反応であり M/G1 期に起こる。まず ORC が origin に結合し、続いて Cdc6 と Cdt1 がクロマチン上に結合し、最終的に Mcm2-7 複合体がクロマチン上に呼び込まれることで pre-RC が形成される (Fig. 2-3)。

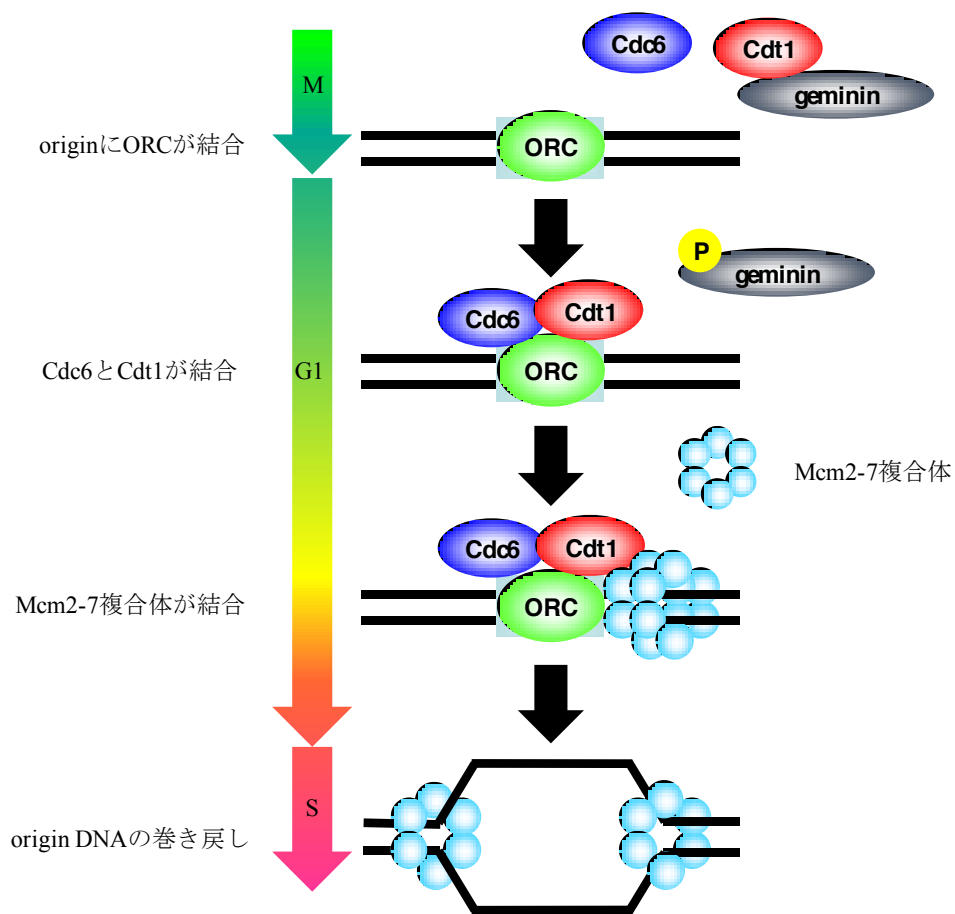


Fig. 2-3 DNA 複製ライセンス化機構

細胞周期の M 期後期から G1 期にかけて、ORC 依存的に Cdc6 と Cdt1 がクロマチン上に結合する。これに続いて Mcm2-7 複合体がクロマチン上に導入される (pre-RC の形成)。

Cdc6 と Cdt1 のクロマチン上への結合はどちらも ORC に依存しているが、相互の結

合依存性はない。しかしながら当研究室において、最終的に Mcm2-7 複合体を呼び込むためには Cdt1 よりも先に Cdc6 がクロマチン上に結合している必要があることが見出されている (Tsuyama *et al.*, 2005)。

Cdc6 と Cdt1 は Mcm2-7 複合体の導入には必須であるが、そのクロマチン結合の維持には必ずしも必要ない (Donovan *et al.*, 1997; Maiorano *et al.*, 2000)。すなわち Mcm2-7 複合体がクロマチン上に導入されれば ORC、Cdc6、Cdt1 は DNA 複製の開始と進行には必要ないと考えられる (Hua and Newport, 1998; Rowles *et al.*, 1999; Maiorano *et al.*, 2004)。

2.3 DNA 複製の開始

ライセンス化された origin は CDK と DDK (Dbf4-dependent kinase) の 2 つのタンパク質キナーゼの働きにより活性化され、これによって DNA 複製が開始される。CDK と DDK は活性が細胞周期依存的に変動し、G1 期には活性は低いですが S 期に進行すると活性が増大する。

DDK の DNA 複製における主な基質は Mcm2-7 複合体のサブユニットであり、CDK によりリン酸化された Mcm2 が DDK のよりよい基質となる (Lei *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997)。リン酸化された Mcm2-7 複合体に Cdc45 や GINS が結合することで複製開始複合体 (pre-initiation complex: pre-IC) を形成する。その後 origin の巻き戻しとともに DNA polymerase が origin に導入され、DNA 複製が開始される。巻き戻されて一本鎖の状態になった DNA は、DNA polymerase により DNA が合成されるまで一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体 (replication protein A; RPA) が結合することで安定化されている。

2.4 DNA 複製ライセンス化反応の調節

染色体の複製が細胞周期の進行に従って適切なタイミングで一回だけ起こることは、真核細胞の共通原理である。この原理が成り立つためには、DNA 複製開始反応が複製

起点当たり一回だけ起こるように再複製の開始を防止する調節機構が必要である。この調節機構として、pre-RC の形成抑制、すなわち Mcm2-7 複合体の再結合の阻害機構が存在する (Table. 2-1)。

1) CDK による調節機構

CDK は、さまざまな cyclin と結合し細胞周期の各ステージの進行に関わるマスター因子として働く一方、染色体の再複製の抑制においても重要な働きをしている。

M 期後期に CDK 活性が低下すると pre-RC の形成が促進される。その後核膜形成が起こると CDK 活性が再び上昇し、この CDK 活性の持続により pre-RC の再構築が M 期まで阻害される。実際に、CDK がライセンス化に関与するタンパク質をリン酸化することで、それぞれの活性を抑制している例が多数報告されている。出芽酵母では ORC subunit の一つである Orc2 が CDK によりリン酸化を受けてその機能が抑制されることが知られている (Vas *et al.*, 2001)。また、Cdc6 は S 期に CDK によるリン酸化を受けることで分解される (Elsasser *et al.*, 1999)。さらに、出芽酵母ではクロマチン上へ結合していない Mcm2-7 複合体は CDK によるリン酸化に依存して核外へ輸送される (Labib *et al.*, 1999)。G2 期に CDK 活性を人為的に低下させることで過剰な DNA 複製が誘発されることから、CDK によるライセンス化の制御が再複製を抑制するうえで重要であると考えられる。

2) geminin による調節機構

geminin は anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) を介したユビキチン化を受け M 期で分解されるタンパク質として同定された (McGarry and Kirschner, 1998)。その後 geminin の coiled-coil 領域の N 末側で Cdt1 と結合し、coiled-coil 領域で Cdt1 と Mcm2-7 複合体の結合を阻害することで Mcm2-7 複合

体のクロマチンへの導入を抑えることが明らかとなった (Lee *et al.*, 2004)。

APC/C によるユビキチン化を介して *geminin* が分解されることにより *Cdt1* が遊離し、ライセンス化が進行すると考えられている。*geminin* を欠損したヒト細胞では DNA の再複製が引き起こされることが報告されている (Melixetian *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004)。このことから *geminin* による *Cdt1* の抑制も再複製を抑制するために重要であると考えられる。

	出芽酵母	分裂酵母	アフリカ ツメガエル	ヒト
ORC	CDK 依存的なリン酸化による不活性化		CDK 依存的に複合体が不安定化	
Cdc6	CDK 依存的なリン酸化による分解		CDK 依存的に核外輸送	
Cdt1	核外輸送	CDK 依存的に分解	<i>geminin</i> による抑制 DNA 複製依存的に分解	
Mcm2-7 複合体	CDK 依存的に核外輸送		クロマチンとの親和性低下	

Table. 2-1 DNA 複製ライセンス化因子の抑制機構

DNA 複製ライセンス化因子は CDK を介して抑制される。種によって異なる抑制機構が複数存在し、それらが重複して機能している。*Cdt1* は CDK 以外にも *geminin* によって直接抑制される。

第3節 チェックポイント機構

親細胞から娘細胞に遺伝情報を伝達する際、誤った情報が伝えられると細胞死や細胞の癌化といった危険を招きかねない。そこで細胞周期の各ステップを監視する機構としてチェックポイント機構が存在する (Fig. 2-4)。DNA に異常が生じるとチェックポイント機構は細胞周期の進行を停止して異常を修復するための時間を確保し、修復を完了してから次のステップに移行させる。

電離放射線の照射によって DNA 二本鎖切断が生じると ATM (ataxia telangiectasia mutated) が活性化される。ATM は毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia: AT) の原因遺伝子産物として発見されたタンパク質リン酸化酵素であり (Savitsky *et al.*, 1995)、チェックポイント機構の制御因子として機能する。

DNA 二本鎖切断により活性化された ATM は Chk1 や Chk2 をリン酸化し、CDK2 を活性化する Cdc25 を抑制することで細胞周期を停止させる (Falck *et al.*, 2001; O'Neill *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2003)。

紫外線およびアルキル化剤による DNA 傷害や dNTP の欠乏は DNA 複製の停止を引き起こし、これによって ATR (ataxia telangiectasia and rad3-related) が活性化される。ATR は Chk1 のリン酸化を介して Cdc25 や Cdc7 を抑制し、細胞周期の停止と DNA 複製フォークの安定化を誘導する (Nyberg *et al.*, 2002; Costanzo *et al.*, 2003)。DNA 複製フォークが崩壊し DNA の切断が起こった場合には ATM も活性化される。

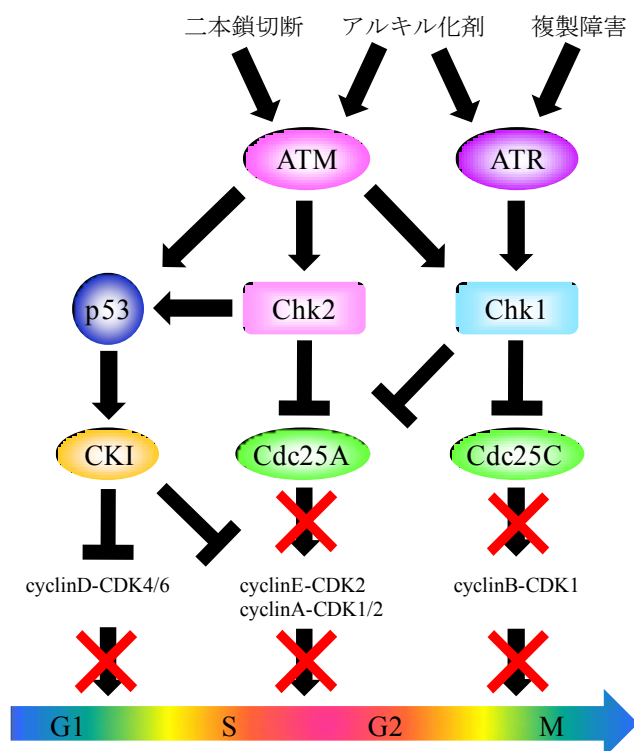


Fig. 2-4 チェックポイント機構
 正常な細胞周期進行においては活性化されないが、DNA の異常が検出されると活性化され、特定の位置で細胞周期の進行を停止し、修復の時間を確保する。

DNA 傷害を誘発すると Cdt1 や Cdc6 が分解されることが報告されている (Blow and Dutta, 2005; Duursma and Agami, 2005)。また、DNA の再複製によってチェックポイント機構が活性化することも知られている (Li and Blow, 2005)。これらのことからチェックポイント機構と DNA 複製ライセンス化機構の連関が示唆される。

第 4 節 アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞実験系

4.1 アフリカツメガエル初期胚の細胞周期

アフリカツメガエルの卵母細胞は、第一減数分裂前期で細胞周期を停止しており、ゴナドトロピンの刺激によりプロゲステロンが分泌されると細胞周期が進行する。しかし第二減数分裂中期に入ると再び細胞周期を停止し、未受精卵として受精を待つ。その後、受精が起こると細胞内 Ca 濃度が上昇することにより細胞周期の停止が解除され、S 期と M 期のみを繰り返す初期胚の細胞周期が 12 回起こる。この時、遺伝子の転写は起こらず、細胞周期の進行に関わるタンパク質はすべて卵内に蓄えられている mRNA あるいはタンパク質によって供給される。13 回目以降は G1 期と G2 期を含む体細胞の細胞周期に移行し転写が開始される。

4.2 アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系

アフリカツメガエル卵抽出液に核膜を除去した精子核 DNA を添加すると、停止していた細胞周期が再開し、クロマチンの脱凝縮、核膜形成、DNA 複製、染色体凝集が起こる (Lohka and Masui, 1983)。体細胞における細胞周期の進行には遺伝子の転写が不可欠であるが、卵抽出液中には細胞周期を進行させるための多くのタンパク質や mRNA が含まれており、転写はほとんどおこなわれない。また、自発的に細胞周期を同調しているため、S 期、M 期の二種の卵抽出液を作り分けることが可能である。さらに、量的

にも確保しやすく、タンパク質分解酵素系がさほど活発でないため、生化学的解析が容易である。これらの性質から、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系は細胞周期研究に有用な実験系として広く利用されてきた (Fig. 2-5)。

この実験系では、目的タンパク質に特異的な抗体を用いることにより、タンパク質の核内局在やクロマチン上への結合を検出することができる。また、免疫除去法により卵抽出液中から特定のタンパク質を除くことで、細胞を用いた実験系では致死となる条件下においても詳細な解析が可能である。

これにより、従来の遺伝学的解析や生化学的解析とは異なる、新たな知見を数多く与えてくれることが期待できる。

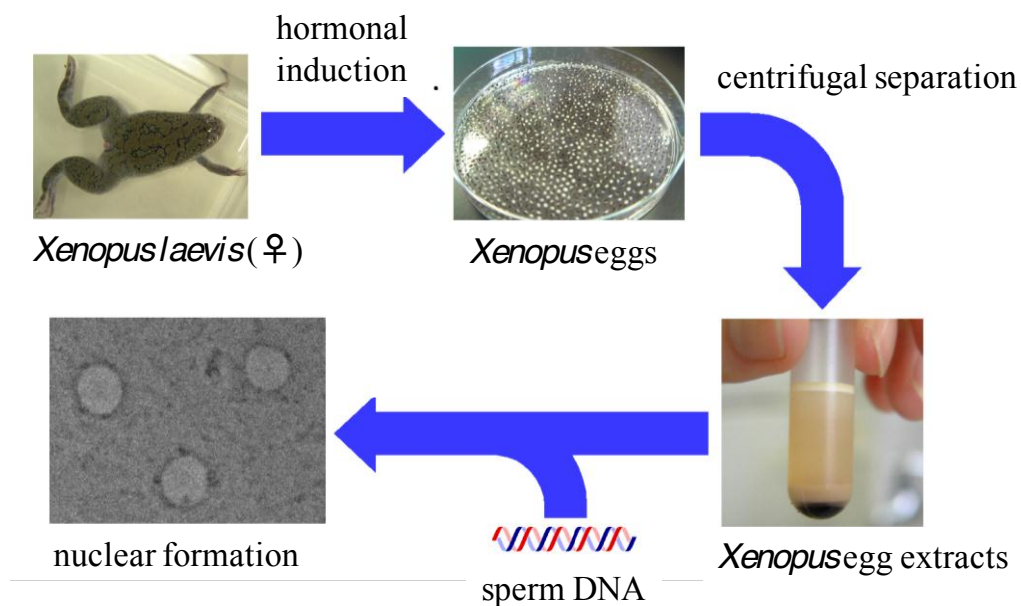


Fig. 2-5 アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系

アフリカツメガエルの卵を遠心破碎して得られた卵抽出液に核膜を除去した精子核 DNA を加えることにより、初期胚で観察される一連の細胞周期の進行を試験管内で容易に再現することができる。

第5節 本研究の目的

前述したとおり、DNA 複製を正常に進行させ、再複製を抑制するために DNA 複製ライセンス化反応関連タンパク質は様々な制御を受けている。とりわけ長大で複雑なゲノムを持つ高等真核生物はより複雑な制御機構を持っていると考えられるが、その詳細は未解明な部分が多い。そこで本研究は細胞周期に依存してタンパク質量が厳密に制御されている Cdt1 の活性制御機構に焦点をあて研究をおこなった。

これまで当研究において、卵抽出液に精製 Cdt1 を添加すると DNA 複製が抑制されることが見出された。また、これに geminin を加えると DNA 複製の抑制が解除された。geminin の代わりに、Cdt1 との結合領域を持つがライセンス化を抑制するのに必須な領域を欠損した geminin 断片 (Gem79-130) を加えても、DNA 複製の抑制が解除され、さらに再複製が引き起こされた。しかしこの抑制に関する詳細なメカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、この機構を明らかにすることを目的に解析をおこなった。

第3章 結果

第1節 Cdt1 組換えタンパク質の添加による DNA 複製の抑制

これまでに当研究室において、卵抽出液を用いた無細胞 DNA 複製実験系に GST を融合させた組換え Cdt1 タンパク質 (GST-Cdt1) を添加することにより、チェックポイント機構を活性化する異常な DNA 複製が誘導されることに加え、DNA 複製における新生鎖 DNA 伸長反応がチェックポイント機構非依存的に抑制されることが示された。そこで、本研究ではこの DNA 複製の抑制についてさらに解析を進めた。

DNA 複製における新生鎖伸長反応は、鋳型となる DNA が DNA helicase によって一本鎖 DNA に開裂した後に、DNA polymerase によって進行する。このため、このどちらか一方を Cdt1 が阻害することにより新生鎖伸長反応が抑制されるのではないかと予想した。DNA polymerase を阻害する薬剤の一つに aphidicolin がある。アフリカツメガエル卵抽出液に aphidicolin を添加することで DNA helicase は機能し続けるが DNA polymerase は阻害されるため、一本鎖 DNA が露出して一本鎖結合タンパク質である RPA がクロマチン上に大量に結合する。その結果 ATR-Chk1 経路を介したチェックポイント機構が活性化されることが報告されている (Byun *et al.*, 2005)。

そこで、アフリカツメガエル卵抽出液に過剰な GST-Cdt1 を加え、DNA 複製を抑制したときの RPA のクロマチン結合を観察した (Fig.3-1)。その際、過剰な Cdt1 の添加により DNA の再複製が誘導されチェックポイント機構が働くことでも DNA 複製が阻害されることが報告されているため、DNA 複製を一回に制限する必要がある。そこで CKI として Cdk2 を不活性化する p21 を一回目の origin 活性化の後に添加することで DNA の再複製を抑止した。

また、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系においては 20 分までに DNA 複製ライセンス化反応が完了し、35 分までに origin の活性化が起こる。さらに 90 分後には

DNA 複製が完了する。RPA の subunit である Rpa30 は DNA 複製時にクロマチンに結合する。また、DNA 複製の開始、複製フォークの進行に関わる Cdc45 はライセンス化後にクロマチン上に導入され、DNA 複製が完了するまでクロマチンに結合する。

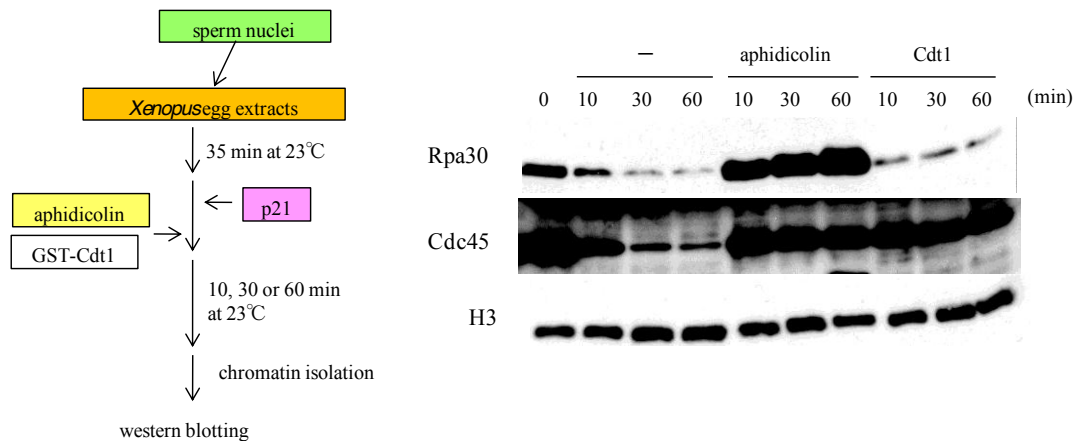


Fig. 3-1 Cdt1 の添加による新生鎖伸長反応抑制時に RPA はクロマチン上に蓄積しない。

精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) とともに 35 分インキュベートした卵抽出液に p21、aphidicolin (終濃度 40 μg/ml)、Cdt1 (終濃度 80 nM) を加えさらにインキュベートした。パネル上部に示した反応時間でクロマチン画分を単離し、パネル左に表示したタンパク質のクロマチン結合をウェスタンブロット法により解析した。

結果として、GST-Cdt1 の添加により Rpa30 のクロマチン上への蓄積は観察されなかった。一方、Cdc45 はクロマチン上に蓄積し続けているため、DNA 複製は完了していないことが確認できる。DNA polymerase を阻害する aphidicolin を添加した場合には、先に述べたとおり Cdc45 と同様に Rpa30 のクロマチン上への蓄積が見られる。つまり、Cdt1 の添加により一本鎖 DNA の過度な露出は起こらないため、Cdt1 は DNA polymerase ではなく DNA helicase を阻害しているのではないかと考えられた。

これをさらに検証するため、p21 で新規の DNA 複製開始を抑制した条件下で aphidicolin と GST-Cdt1 を同時に (Fig 3-2, lane 6)、あるいは順次添加し (lane 7, 8)、Rpa30

のクロマチン結合を観察した。

同時に、aphidicolin あるいは GST-Cdt1 を添加してインキュベーションした後、一旦クロマチン画分を単離することで、複製フォークの進行が停止した状態でクロマチンを単離し、これを新しい卵抽出液に加えると DNA 複製が再開されて Rpa30 のクロマチン結合を検出する実験もおこなった (lane 9,10)。

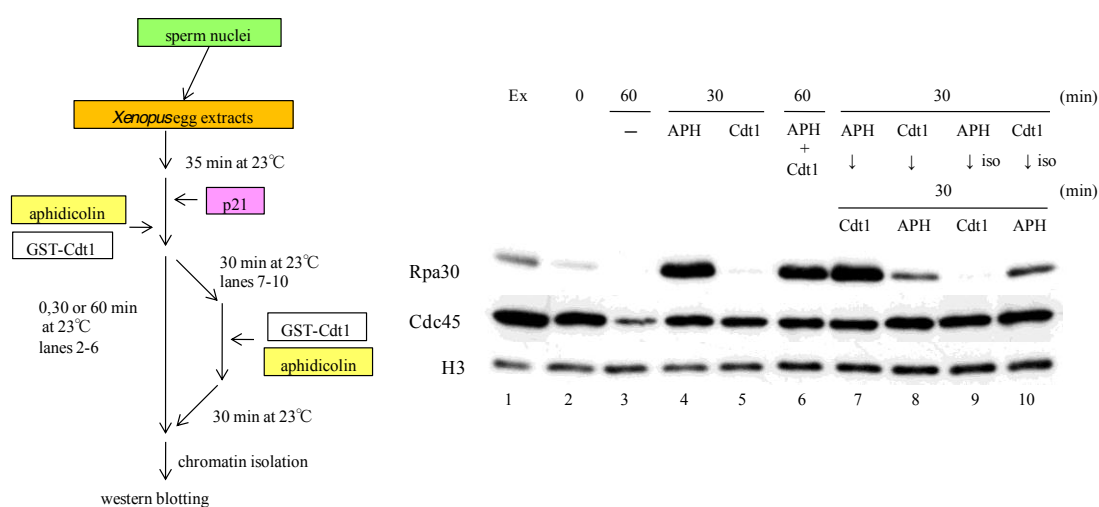


Fig. 3-2 Cdt1 の添加は DNA helicase を阻害することで DNA 複製を阻害する。

精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) とともに 35 分インキュベートした卵抽出液に p21、aphidicolin (終濃度 40 μg/ml)、Cdt1 (終濃度 80 nM) を加えさらに 23°C でインキュベートした。lane 2-6; パネル上部に示した反応時間でクロマチン画分を単離し、パネル左に表示したタンパク質のクロマチン結合をウェスタンブロット法により解析した。lane 7,8; 30 分後、Cdt1 あるいは aphidicolin を加えさらに 30 分間インキュベートした。その後クロマチン画分を単離し、パネル左に表示したタンパク質のクロマチン結合をウェスタンブロット法により解析した。lane 9,10; 30 分後、クロマチン画分を単離し aphidicolin クロマチン (lane 9)、Cdt1 クロマチン (lane 10) を調製した。このクロマチン画分を新しい卵抽出液に混合し、さらに 30 分間インキュベートした。その後再びクロマチン画分を単離し、パネル左に表示したタンパク質のクロマチン結合をウェスタンブロット法により解析した。

コントロールとして緩衝液 (LFB2/50) を使用した。APH: aphidicolin、iso; isolation

その結果、aphidicolin を加えてインキュベーションした反応液に GST-Cdt1 を加えると、Rpa30 の蓄積が観察された (lane 7)。逆に Cdt1→aphidicolin の順に加えると Rpa30 の蓄積は減少した (lane 8)。このことより、Cdt1 は aphidicolin で露出した一本鎖 DNA

を解消できないこと、Cdt1 であらかじめ停止した複製フォークでは aphidicolin による一本鎖の露出が起こりにくいこと、の二点が示唆された。しかし、lane 5 に比べ lane 8 で Rpa30 のクロマチン上への蓄積が多いことから、aphidicolin が DNA polymerase を強固に抑制しているのに対し、Cdt1 は DNA helicase をゆるく阻害しているのではないかと考えられる。このことは、aphidicolin と Cdt1 を同時に添加した場合に Rpa30 の蓄積が起こることからも推察できる (lane 6)。aphidicolin を加えてインキュベーションしたあとに一旦クロマチンを単離し、これを GST-Cdt1 と p21 を添加した新しい卵抽出液に加えさらに反応させた場合には、Rpa30 の蓄積は観察されなかった (lane 9)。逆に GST-Cdt1 を添加した抽出液と反応したのちにクロマチンを単離し、aphidicolin と p21 を添加した卵抽出液に加えさらに反応させた場合には、Rpa30 のクロマチン結合が観察された (lane 10)。これは、aphidicolin で露出した一本鎖 DNA が Cdt1 存在下でも効率よく二本鎖に変換されることを示している。ことこのことから、Cdt1 によって一旦停止した複製フォークでも Cdt1 を取り除くことによって複製を再開することができると考えられる。

以上の結果をまとめると、Cdt1 を添加することにより誘発される新生鎖 DNA 伸長反応の阻害は DNA helicase を可逆的に抑制することにより引き起こされと考えられる。

第2節 Cdt1 による DNA 複製の抑制とチェックポイント機構

アフリカツメガエル卵抽出液に Cdt1 を添加するとチェックポイント機構が活性化され、過剰な DNA 複製が抑制される。このチェックポイント機構は Chk1 のリン酸化を経由することが報告されている (Li and Blow, 2005)。しかし DNA の再複製を抑制した状態で Cdt1 とチェックポイント機構の上流で機能する ATM/ATR の阻害剤である caffeine を卵抽出液に添加しても DNA 複製活性は回復しないことから、Cdt1 による DNA 複製の阻害はチェックポイント機構とは別の何らかの経路が働くことにより引き起こ

されていることが示唆された (Tsuyama *et al.*, 2009)。前節でみられたように RPA のクロマチン上への蓄積が起きないならば、これによる ATR の活性化は起こらず ATR を経由したチェックポイントの活性化も起こらないはずである。これを確認するため、実際に Chk1 のリン酸化が起こっているかどうかを、抗 Chk1 リン酸化抗体を用いて検出した (Fig. 3-3)。ここで用いた Gem79-130 は野生型 *geminin* と同等の Cdt1 との結合能を示すが、Cdt1 と Mcm2-7 複合体との相互作用を阻害する領域を欠いているため、ライセンス化を抑制する活性をもたない *geminin* 断片である (*geminin* の 79-130 a.a.)。この Gem79-130 は、Cdt1 による DNA 複製の阻害を解除しさらなる再複製を引き起こすことが知られている (Tsuyama *et al.*, 2009)。

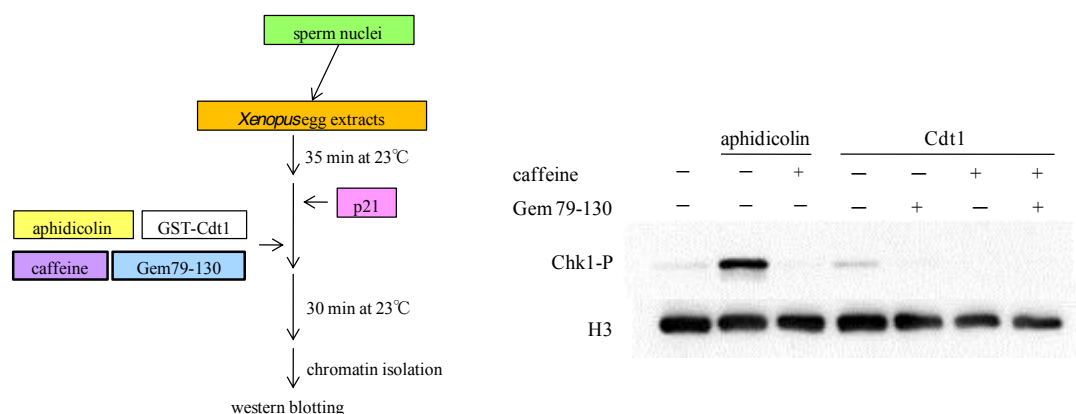


Fig. 3-3 Cdt1 添加による DNA 複製の抑制にチェックポイント機構は関与しない。

精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) とともに 35 分インキュベートした卵抽出液に p21、aphidicolin (終濃度 40 μg/ml)、Cdt1 (終濃度 80 nM)、caffeine (終濃度 5 mM)、Gem79-130 (終濃度 8 μM) を加えさらに 30 分間インキュベートした。反応後クロマチン画分を単離し、ウェスタンブロット法により Chk1 の Ser344 (human Chk1 の Ser345 に相当) のリン酸化を検出した。

コントロールとして緩衝液 (LFB2/50) を使用した。Chk1-P; Phosphorylation of Chk1-Ser344

aphidicolin を添加することで Chk1 のリン酸化を引き起こすことが知られているが、

GST-Cdt1 を添加した場合 aphidicolin 添加時のような Chk1 のリン酸化はみられなかった。このことから、Cdt1 添加により DNA 複製を抑制した場合にはチェックポイント機構の効率的な活性化が起こらないことが確認された。この結果から、過剰な Cdt1 が DNA helicase を阻害することで DNA 複製が停止するため一本鎖 DNA の露出がなく、チェックポイント機構も働かないのではないかと考えられる。ただし、Gem79-130 の共存により GST-Cdt1 添加時のわずかな Chk1 のリン酸化が抑制されたことから、GST-Cdt1 添加による新生鎖伸長反応の抑制に応じて ATR の活性化がわずかながら引き起こされるものと思われた。

第 3 節 Mcm2-7 複合体結合領域に変異を加えた組換え Cdt1 による DNA 複製

これまでの実験により、Cdt1 添加による DNA 複製の抑制は DNA helicase を阻害することにより引き起こされることが示唆された。

真核生物において、DNA 複製の際 DNA helicase として働くタンパク質は Mcm2-7 複合体であり、これを GINS、Cdc45 が補助することで Mcm2-7 複合体がクロマチン上に結合し続け、二本鎖 DNA を一本鎖に開裂していくと考えられている (Moyer *et al.*, 2006)。Mcm2-7 複合体は Cdt1 の C 末端と結合することが知られている (Yanagi *et al.*, 2002; Ferenbach *et al.*, 2005)。そこで、アフリカツメガエル Cdt1 の C 末に位置する Mcm2-7 結合領域に変異を加えた組換えタンパク質を作製し、そのライセンス化活性と DNA 複製活性を測定した (Fig. 3-4)。ライセンス化活性の測定は以下のようにおこなった。まず Cdt1 を免疫除去することで、ライセンス化活性を欠損させた卵抽出液に、組換え Cdt1 と精子核 DNA を添加しインキュベーションした。これにより添加した組換え Cdt1 の活性に応じて精子核 DNA がライセンス化される。その後、この反応液に geminin を加えライセンス化が起こらない状態にした卵抽出液と ³²P-dATP を加え再びインキュベーションすることで、一回目のインキュベーションでライセンス化された DNA のみを複製

させた。この DNA 合成量を測定することで組換え Cdt1 のライセンス化活性とした。

GST-Cdt1-ΔS1 は結合領域中のβシート構造に変異を導入した Cdt1 であり、同様の変異を加えたマウスの Cdt1 では Mcm2-7 複合体との結合およびライセンス化活性が顕著に低下することが報告されている (Khayrutdinov *et al.*, 2009)。GST-Cdt1-ΔH1 はαヘリックス構造に変異を導入した Cdt1 であり、ヒト Cdt1 で Mcm2-7 複合体との結合が著しく低下する変異体 (Teer and Dutta, 2008) のうち 2 種類を組み合わせで作製した。GST-Cdt1-KKAA は Cdt1 の ATP 結合ドメインに変異を加えたものである。マウス Cdt1 を用いた実験で Cdt1 が ATP と結合すること、Cdt1 が Mcm4,6,7 複合体と結合し試験管内で Mcm4,6,7 複合体の DNA helicase 活性を促進すること、マウス Cdt1-KKAA では Mcm4,6,7 複合体との結合が低下し、DNA helicase 活性の促進効果が減弱することが明らかとなっている (You and Masai, 2008)。

その結果、ライセンス化活性は GST-Cdt1-ΔS1 では約 1/4、GST-Cdt1-KKAA では約 1/2 の効率に低下した。これに対し、GST-Cdt1-ΔH1 では著しくライセンス化活性が低下した (Fig. 3-4 a and c)。また、DNA 複製阻害活性は GST-Cdt1-ΔS1 でも GST-Cdt1-KKAA でも 1/2 程度に低下し、GST-Cdt1-ΔH1 に至っては DNA 複製の抑制が観察されなかった (Fig. 3-4 b and d)。つまり、ライセンス化活性と相関して DNA 複製阻害効果がみられた。

GST-Cdt1-ΔH1 では連続した 9 個のアミノ酸に変異を導入しているため構造が大きく変わってしまっている可能性があることなどから、はっきりと結論づけることは難しいが、これらの変異体タンパク質においてライセンス化活性と DNA 複製抑制活性は良い相関がみられた。これらのタンパク質のライセンス化活性の低下は Mcm2-7 複合体との親和性が減弱することによると考えられるため、Cdt1 は Mcm2-7 複合体との結合を介することで DNA 複製の阻害を引き起こしているということが示唆された。

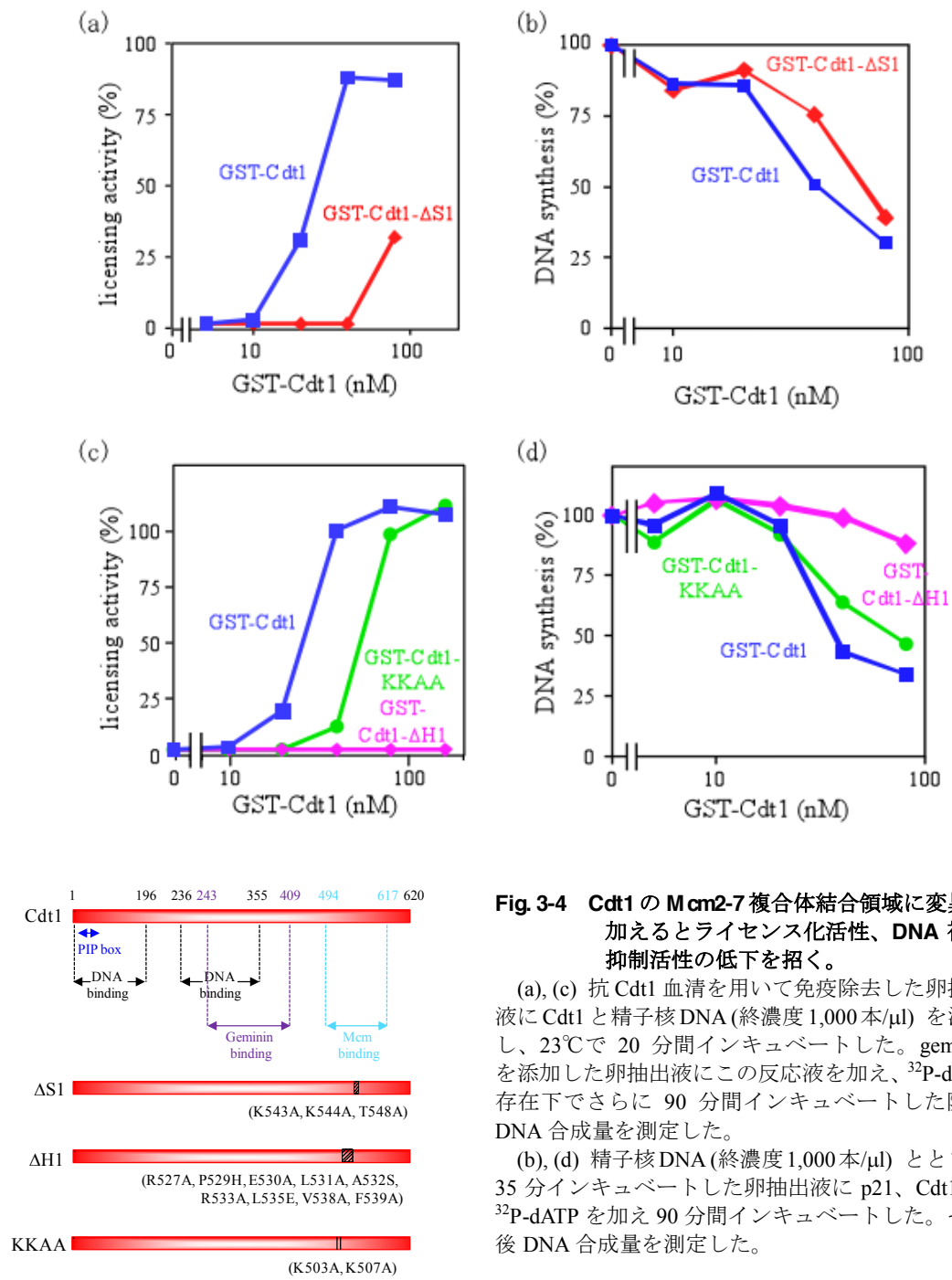


Fig. 3-4 Cdt1 の Mcm2-7 複合体結合領域に変異を加えるとライセンス化活性、DNA 複製抑制活性の低下を招く。

(a), (c) 抗 Cdt1 血清を用いて免疫除去した卵抽出液に Cdt1 と精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) を添加し、23°C で 20 分間インキュベートした。geminin を添加した卵抽出液にこの反応液を加え、³²P-dATP 存在下でさらに 90 分間インキュベートした際の DNA 合成量を測定した。

(b), (d) 精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) とともに 35 分間インキュベートした卵抽出液に p21、Cdt1、³²P-dATP を加え 90 分間インキュベートした。その後 DNA 合成量を測定した。

第4節 N末を欠損した組換え Cdt1 による DNA 複製

次に、Cdt1 の N 末端を欠失した変異体を作製し (239-620 a.a.; GST-Cdt1-ΔN)、DNA 複製に対する影響を調べた。

GST-Cdt1-ΔN は Mcm2-7 複合体との結合領域を保持しており、マウスの GST-Cdt1-ΔN において Mcm2-7 複合体と結合することも報告されている (Khayrutdinov *et al.*, 2009)。また、GST-Cdt1-ΔN は野生型タンパク質と同様のライセンス化活性を有することも知られている。したがって、GST-Cdt1-ΔN は Mcm2-7 複合体と結合し、DNA 複製を抑制すると予想された。

まず、GST-Cdt1-ΔN を添加したときに新生鎖 DNA 伸長反応に影響を及ぼすかどうかを、アルカリアガロースゲル電気泳動法を用いて検討した (Fig. 3-5)。

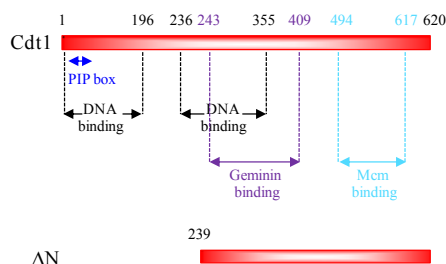
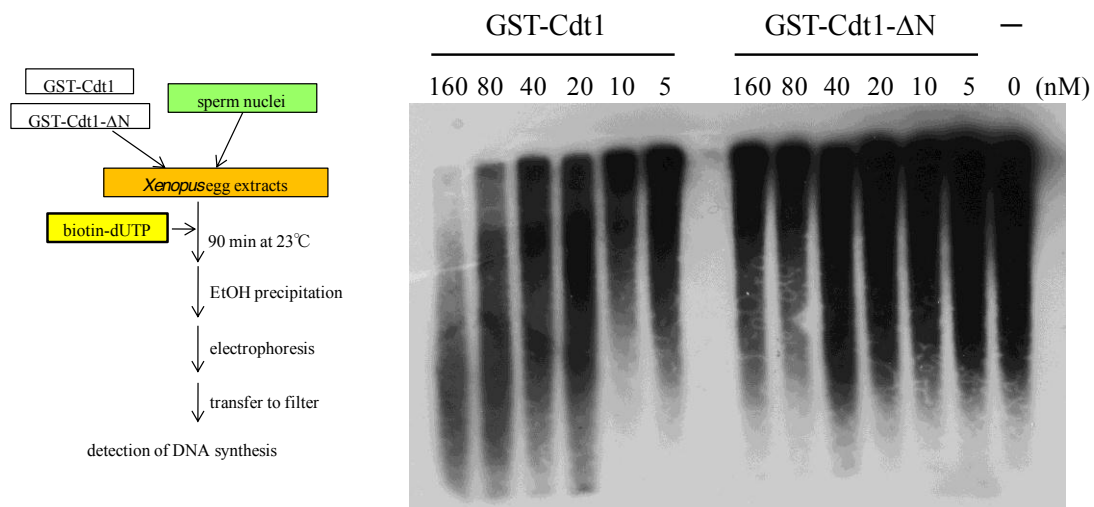


Fig3-5 GST-Cdt1-ΔN は新生鎖 DNA 伸長反応を阻害しない。

Cdt1 を卵抽出液に添加し、biotin-dUTP 存在下で精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) を 23°C で 90 分間インキュベートした。その後 DNA 複製反応を停止し、アルカリアガロースゲル電気泳動法によりビオチンを取り込んだ DNA を検出した。コントロールとして緩衝液 (LFB2/50) を使用した。

予想に反し、GST-Cdt1-ΔN を添加しても新生鎖 DNA 伸長反応は阻害されなかった。この結果より、Cdt1 による DNA 複製時の新生鎖伸長反応の阻害には C 末端側の Mcm2-7 複合体結合領域だけでなく N 末端側も必要であることが示唆された。また、より高濃度の GST-Cdt1-ΔN を添加した場合、新生鎖 DNA 伸長反応の阻害は観察されないものの、わずかながら DNA 合成量の減少がみられる。この結果は ^{32}P -dATP の取り込みにより DNA 複製活性を測定した時にも観察された (data not shown)。この理由についてはまだ明らかとなっておらず、今後検討する必要がある。

もしライセンス化活性と DNA 複製阻害活性に相関があれば、GST-Cdt1-ΔN のライセンス化活性が著しく損なわれていることが予想される。そこで、ここで用いた GST-Cdt1-ΔN がライセンス化活性を示すかについて確認した (Fig. 3-6)。

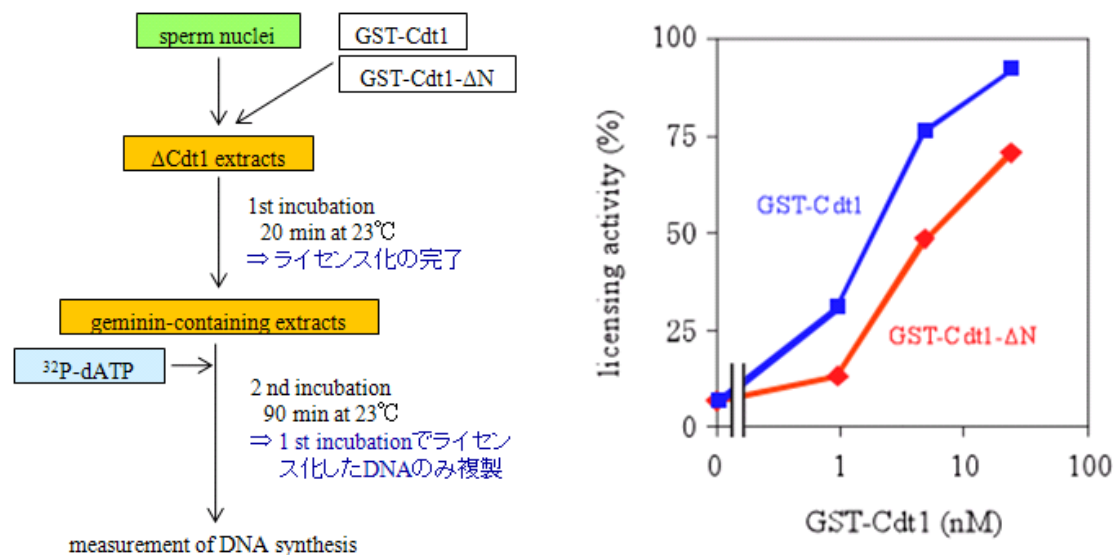


Fig. 3-6 GST-Cdt1-ΔN のライセンス化活性は WT の 1/2 程度である。

抗 Cdt1 血清を用いて免疫除去した卵抽出液あるいは緩衝液 (LFB2/50) に Cdt1 と精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) を添加し、23°C で 20 分間インキュベートした。この反応液を geminin を添加した卵抽出液に加え、 ^{32}P -dATP 存在下でさらに 90 分間インキュベートした。その後 DNA 合成量を測定した。

その結果、GST-Cdt1-ΔN は GST-Cdt1 に比べて若干の低下はみられたものの、顕著なライセンス化活性を示した。

次に GST-Cdt1-ΔN とともに caffeine や Gem79-130 を添加した時の、DNA 複製への影響について検討した。これまでに GST-Cdt1 とともに caffeine を添加した場合には origin の活性化が頻発することにより DNA 合成量は増加するが、新生鎖伸長反応の解除は起こらないこと、Gem79-130 を添加した場合には新生鎖伸長反応が解除されるだけでなく、添加した Cdt1 のライセンス化活性により更なる DNA の再複製が引き起こされることが明らかとなっている (Tsuyama *et al.*, 2009)。

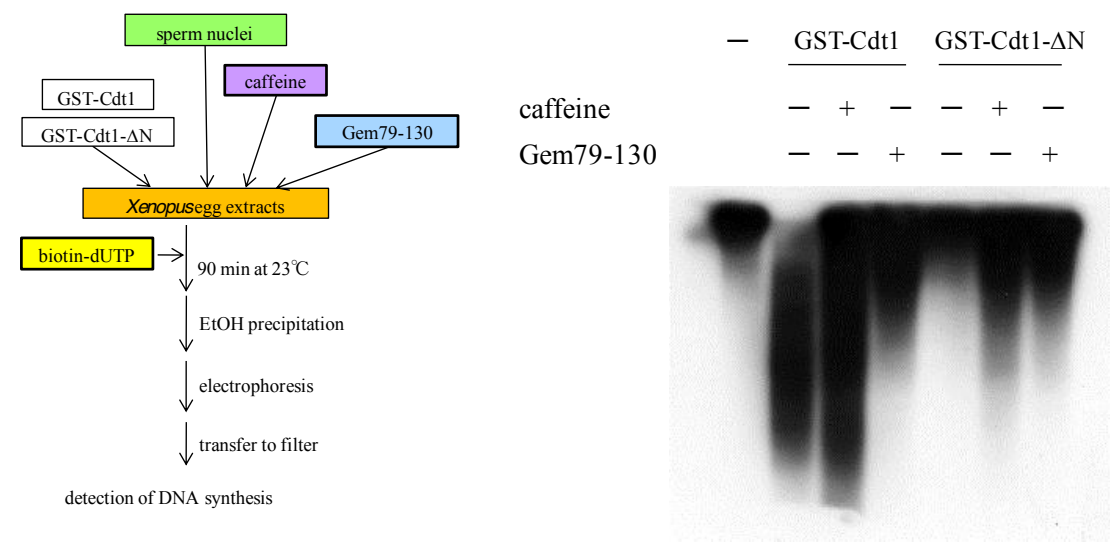


Fig. 3-7 GST-Cdt1-ΔN とともに caffeine、Gem79-130 を添加すると DNA 合成量は増大する。
 Cdt1 (終濃度 80 nM)、caffeine (終濃度 5 mM)、Gem79-130 (終濃度 8 μM) を卵抽出液に添加し、biotin-dUTP 存在下で精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) を 23°C で 90 分間インキュベートした。その後 DNA 複製反応を停止し、アルカリアガロースゲル電気泳動法によりビオチンを取り込んだ DNA を検出した。コントロールとして緩衝液 (LFB2/50) を使用した。

結果として、GST-Cdt1-ΔN とともに *caffeine*、Gem79-130 のどちらを添加した場合においても DNA の合成量が増加した。したがって、GST-Cdt1-ΔN を添加した場合にも DNA 複製はチェックポイント機構により抑制されと考えられた。さらに、新生鎖伸長反応とは異なる段階に作用する DNA 複製抑制効果も存在しており、新生鎖伸長反応の抑制と同様に Cdt1 に対する *geminin* の結合により解除されることが示唆された。

GST-Cdt1-ΔN で欠失している Cdt1 の N 末側には PCNA 結合領域と、この結合に依存したユビキチン化部位、および DNA 結合領域が存在することが報告されている。このうち、PCNA の結合は DNA 複製の抑制に直接寄与しないことを明らかにしている。したがって、DNA 複製の阻害には Cdt1 と DNA との結合が関与しているのではないかと考えられる。これを確かめるためには、GST-Cdt1-ΔN と DNA が結合するかどうか、などの更なる検討が必要である。

第4章 考察

第1節 GST-Cdt1 添加によって引き起こされる DNA 複製の阻害は

Mcm2-7 複合体を介して誘導される。

GST-Cdt1 を S 期の卵抽出液に過剰に添加した場合には、aphidicolin により DNA 複製を停止させた際に見られるような RPA のクロマチン結合が観察されなかった (Fig. 3-1)。また、Mcm2-7 複合体結合領域に変異を加えた組換え Cdt1 ではライセンス化活性と相関して DNA 複製阻害効果が減弱した (Fig. 3-4)。このことから GST-Cdt1 を添加することによって引き起こされる DNA 複製の阻害は DNA helicase である Mcm2-7 複合体を介して誘導されることが示唆された。

アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系において、過剰な Cdt1 を添加することにより DNA の再複製が誘導されるとチェックポイント機構が働き、更なる複製を抑制することが知られている。しかし、再複製を抑制した状態で Cdt1 に加えてチェックポイント機構を阻害する *caffeine* を卵抽出液に添加しても DNA 複製活性は回復しないことから、Cdt1 による DNA 複製の阻害はチェックポイント機構とは別の、何らかの経路が働くことにより引き起こされていると考えられてきた (Tsuyama *et al.*, 2009)。

aphidicolin は dCTP、dTTP のアナログとして作用することで DNA polymerase を阻害する。アフリカツメガエル卵抽出液に aphidicolin を添加すると、DNA helicase は機能し続けるが DNA polymerase が阻害されるため、一本鎖 DNA が露出してそれを保護する RPA が大量に結合する。その結果 ATR-Chk1 経路を介したチェックポイント機構が活性化されることが報告されている (Byun *et al.*, 2005)。しかし、本研究において DNA の再複製を抑制した状態で GST-Cdt1 を添加した場合には、aphidicolin を添加した場合とは

異なり Chk1 のリン酸化が起こらなかった (Fig. 3-3)。これより、S 期において過剰な GST-Cdt1 が存在した場合には、DNA polymerase の活性は維持されるが、DNA helicase による鋳型 DNA の巻き戻しが進行しないために DNA 複製における新生鎖伸長反応が抑制されることが示唆された。したがって、Cdt1 による DNA 複製の抑制に際して一本鎖 DNA が過度に露出されることはなく、チェックポイント機構の活性化も引き起こされないものと考えられた。

Cdt1 は PIP box を介して PCNA と結合することが知られている。また、DNA polymerase にも PIP box が存在し (Eissenberg *et al.*, 1997; Bruning and Shamoo, 2004)、PCNA が DNA polymerase の補助因子として働くことで効率よく DNA が合成される。したがって、Cdt1 と PCNA が結合することにより PCNA と DNA polymerase が結合できなくなり DNA 複製が抑制されたり、あるいは PCNA を介して Cdt1 と DNA polymerase が相互作用し DNA 複製を阻害するというような、PCNA を介した DNA 複製抑制が Cdt1 により引き起こされる可能性も考えられた。しかし、Cdt1 の PIP box に変異を入れた GST- Δ PIP-Cdt1 を卵抽出液に添加した場合にも GST-Cdt1 と同様の挙動を示すことが報告されているため (Tsuyama *et al.*, 2009)、過剰な Cdt1 が PCNA の機能を介して DNA polymerase を阻害しているとは考え難い。

Cdt1 は Mcm2-7 複合体のうち Mcm6 と結合することが報告されている。しかし Mcm6 の Cdt1 結合領域はまだ明らかとなっていない。Cdt1 が結合する領域を明らかにすることができれば、この領域に変異をいれた組換えタンパク質を用いて DNA 複製を観察することで、さらにはっきりとした証拠が得られるかもしれない。

第2節 GST-Cdt1による新生鎖DNA伸長反応の阻害には

DNA結合領域を含むN末端側も必要である。

Cdt1によるDNA複製の抑制にはCdt1とMcm2-7複合体との結合が必要であることが強く示唆された。これに対し、Mcm2-7複合体への結合を始めとしたDNA複製ライセンス化に寄与する機能には欠損が見られないN末側欠失変異体(239-620 a.a.; GST-Cdt1-ΔN)を卵抽出液に添加した場合には、野生型Cdt1と同様のDNA複製の抑制が観察されると予想した。しかしながら、実際には新生鎖DNA伸長反応の阻害は観察されなかった(Fig. 3-5)。このことから、Cdt1による新生鎖DNA伸長反応の阻害にはCdt1とMcm2-7複合体との結合だけではなく、Cdt1のN末側に存在する機能も必要であることが示唆された。この領域には、先に述べたPIP boxやPIP boxとPCNAとの結合に応じたユビキチン化部位のほか、AT hook構造を介したDNA結合活性が存在することが報告されている。

GST-Cdt1-ΔNは野生型Cdt1の約1/3を欠損しており、高次構造の安定性が変化したために新生鎖DNA伸長反応の阻害が誘導されなかった可能性も考えられる。しかし、GST-Cdt1-ΔNがライセンス化活性を示すことから(Fig. 3-6)、安定な構造が保たれていると考えている。

また、高濃度のGST-Cdt1-ΔNを添加することによりわずかながらDNA合成量の減少が観察され(Fig. 3-5)、このDNA合成の抑制はGem79-130の同時添加により回復した(Fig. 3-7)。

これらの結果から、Cdt1 が DNA 複製における新生鎖伸長反応を抑制する際、C 末は Mcm2-7 複合体と結合して DNA 複製を止めるのに必須の役割を果たし、N 末は Mcm2-7 複合体を DNA 上に固定するために補助をする役割を果たしていると考えられる。

第3節 今後の展望

今回の GST-Cdt1- Δ N に関する実験では DNA 複製、とくに新生鎖伸長反応の抑制のみを調べており、この抑制にかかわる N 末領域の機能が DNA への結合であるとは言い切れない。GST-Cdt1- Δ N を添加した場合に DNA 複製関連タンパク質はクロマチン上に結合し続けているのか、また GST-Cdt1- Δ N 自身は DNA と結合することができるのかなどを改めて検討する必要がある。さらに、N 末を欠損させる長さを変えた変異株等を作ることによってどの領域が新生鎖 DNA の伸長に関わるか、DNA 結合と DNA 複製阻害活性に相関はあるのか調べる必要がある。

DNA 複製の際、一つの origin に対して多くの Mcm2-7 複合体がクロマチン上に結合していることが知られている (Donovan *et al.*, 1997)。Cdt1 が Mcm2-7 複合体に結合して DNA 複製を抑制する際、Mcm2-7 複合体がたくさんあるうち origin に最も近いものに結合しているのか、あるいはすべての Mcm2-7 複合体に結合しているのかについては今回の研究では明らかにすることができていない。Mcm2-7 複合体を免疫除去した卵抽出液に組換え Mcm2-7 複合体を、濃度勾配を与えて加えることで単一 origin 上の Mcm2-7 複合体のコピー数を調節できる可能性がある。この方法を用いることで、この課題に関する手がかりを得ることができるかもしれない。

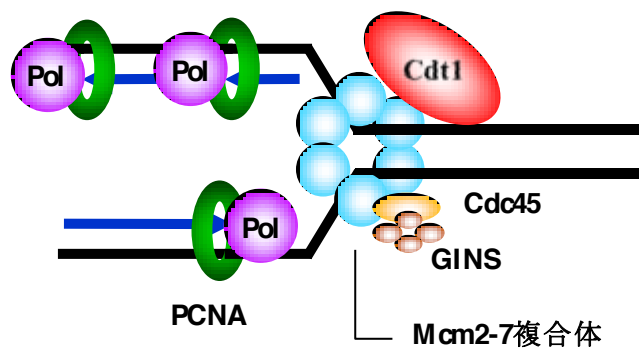


Fig. 4-1 モデル図

Cdt1 は Mcm2-7 複合体と DNA に結合することで DNA 複製を阻害する。

今回、Cdt1 が過剰になった場合に Mcm2-7 複合体や DNA への結合を介して DNA 複製が抑制される可能性を提示した。発がん過程で Cdt1 の発現亢進が認められ、これががん細胞におけるゲノムの不安定化の要因の一つとなっていると考えられている。すなわち、がん細胞では過剰な Cdt1 が存在した条件下でも DNA 複製が抑制を受けにくくなっているのかもしれない。今後、本研究の解析をさらに進めることで、がん細胞と正常細胞の DNA 複製に関する細胞生物学的性質の違いについて新たな知見が得られ、新たながん医療の手法・戦略を展開する手がかりとなることが期待される。

第5章 実験材料及び実験方法

以下に示す材料及び試薬に関して、特に明記していない限り Sigma-Aldrich、Nacalai、Wako のものを使用した。

第1節 アフリカツメガエル卵抽出液 (ULSS) の調製

1.1 材料と試薬

- 1) アフリカツメガエル 雌 (ワタナベ増殖、カトーS カガク)
- 2) PMS (血清性性腺刺激ホルモン) (日本全薬工業)
- 3) chorionic gonadotropin (胎盤性性腺刺激ホルモン) (日本全薬工業)
- 4) modified high salt barth (MHSB)

110 mM NaCl、15 mM Tris、2 mM KCl、1 mM MgCl₂

HCl で pH 7.6 に調整した。

- 5) cystein buffer

2.9% cystein-HCl-H₂O、1 mM EGTA (ethyleneglycol-bis-(β-aminoethlether)-N,
N,N',N'-tetra-acetic acid)

NaOH で pH 7.5 に調整した。

- 6) high salt barth (HSB)

110mM NaCl、15mM Tris、2mM KCl、1 mM MgSO₄、2 mM NaHCO₃、0.5 mM
Na₂HPO₄、2 mM EGTA

HCl で pH 7.6 に調整した。

- 7) unactivated extraction buffer (UEB)

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、5 mM MgCl₂、5 mM EGTA

使用直前に 2-mercaptoethanol を添加した (終濃度 2 mM)。

8) cytochalasin B 溶液

cytochalasin B を終濃度 10 mg/ml になるように DMSO に溶解し-20℃で保存した。

9) extract dilution buffer with sucrose (EDB-S)

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、2 mM DTT (dithiothreitol)、0.4 mM MgCl₂、0.4 mM EGTA、10% sucrose、10 µg/ml pepstatin A (ペプチド研究所)、10 µg/ml leupeptin (ペプチド研究所)

10) 遠心機

大型高速遠心機 TOMY suprema 21、ローターTOMY TS-31

小型高速遠心機 TOMY MX-300、ローターTOMY TMS-21

11) ナイロンメンブラン

30 µm NYLON NET FILTERS NY30 (Millipore)

1.2 方法

アフリカツメガエル雌の産卵を誘導させるため、卵抽出液を調製する 5 日前に 50 U/匹の PMS を皮下投与した。また、前日の夕方には 500 U/匹の chorionic gonadotropin を皮下投与し、投与以降は MHSB 2 L/匹で飼育した。水槽の温度は 18℃から卵を回収する 2 時間前に 22℃になるように設定した。

当日はまず卵を回収し、質の悪い卵を除いた。MHSB をできる限り除き、cystein buffer を加えて静置することで寒天質を除いた。3 回ほど cystein buffer で洗った後、室温の HSB、4℃に冷やした UEB でそれぞれ 3 回ずつ洗った。UEB をできる限り除き、Falcon2059 に移して遠心分離 (800 ×g、4℃、1 min) し、上清と、卵の層の表面に集まった質の悪い卵を除いた。再び遠心分離 (13,000 ×g、4℃、10 min) し上部の黄色いクリーム層を取り除いた後、中央部のクリーム色～黒褐色の層だけを Falcon2059 に回収した。これに 1/1,000 容量の cytochalasin B 溶液と 15%容量の EDB-S を加えてよく

混和した。これを遠心分離 (16,200 ×g、4°C、25 min) し、注射針を用いて DNA 複製に必要な核膜画分を含んでいる中央の黄色い層だけを Falcon2059 に回収した。これを再び遠心 (16,200 ×g、4°C、20 min) し、中央の黄色い層を回収した。これをナイロンメンブランで濾過し、1/100 容量の glycerol を加えた後 20μl ずつ分注し、液体窒素中で凍結保存した。

第2節 アフリカツメガエル精子核 DNA の調製

2.1 材料と試薬

1) アフリカツメガエル 雄 (ワタナベ増殖、カトーS カガク)

2) MS222 溶液

0.2% (w/v) MS222 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate)、0.46% (w/v) NaHCO₃

3) ホモジナイザー

Potter Elvehjem type Teflon glass homogenizer

4) SuNaSp

0.25 M sucrose、75 mM NaCl、0.5 mM spermidine、0.15 mM spermine

5) 3% BSA-SuNaSp

0.25 M sucrose、75 mM NaCl、0.5 mM spermidine、0.15 mM spermine、3% BSA

6) EB

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、5 mM MgCl₂、

使用直前に 2-mercaptoethanol を添加した (終濃度 2 mM)。

7) 30% glycerol-EB

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、5 mM MgCl₂、30% glycerol

使用直前に 2-mercaptoethanol を添加した (終濃度 2 mM)。

8) ヘキスト染色液

Hoechst33258 を終濃度 1 mg/ml となるよう調製し、EB で 500 倍に希釈して使用した。

9) リゾレシチン

L- α -lysophosphatidylcholine, from Egg Yolk を終濃度 2 mg/ml になるように超純水に溶解し-20°Cで保存した。

10) ナイロンメンブラン

30 μ m NYLON NET FILTERS NY30 (Millipore)

11) 遠心機

遠心機 TOMY RL-131、ローターTOMY TS-39

TOMY suprema 21、ローターTOMY TA-22

2.2 方法

アフリカツメガエル雄を MS222 溶液により麻酔し、開腹したのち精巣を摘出した。EB を入れたディッシュに移しピンセットを用いて血管や脂肪組織を綺麗に取り除いた。新たに EB 5 ml を入れたディッシュに精巣を移し、EB 中でハサミを用いて精巣をできる限り細かくした。この懸濁液をホモジナイザーに移し、5 回上下することにより均一にした。ナイロンメンブランで濾過後、遠心分離 (2,500 rpm、4°C、5 min) し上清を取り除いた。その際、下層に赤血球が沈殿している場合は沈殿上部の白濁層だけを別の遠心管に移し、再度遠心分離した (2,500 rpm、4°C、5 min)。沈殿物を室温の SuNaSp 2 ml に懸濁し、その懸濁液にリゾレシチン 100 μ l を加え、室温で 5 分間静置した。サンプル 1 μ l をヘキスト染色液 1 μ l と混合し顕微鏡で脱膜を確認した。脱膜された染色体が 95%以上になるまでリゾレシチン処理を繰り返した。脱膜処理後のサンプルに 3% BSA-SuNaSp 2 ml を加えて 5 分間放置し、リゾレシチンを失活させた。遠心分離 (2,500 rpm、4°C、5 min) したのち上清を取り除き、沈殿物をさらに 3% BSA-SuNaSp 2 ml で 1 回、EB 2 ml で 2 回洗浄した。この沈殿物を 30% glycerol-EB に

懸濁し精子核 DNA とした。

第3節 DNA複製活性の測定

3.1 材料と試薬

1) e.r.

1 M phosphocreatin、0.6 mg/ml creatin phosphokinase

2) CHX

10 mg/ml cycloheximide

3) 20 mg/ml Proteinase K 溶液

20 mg/ml Proteinase K (MERCK)、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、50% (v/v) glycerol

4) Stop C

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EGTA、0.5% SDS

5) 10% TCA 溶液

10% TCA (trichloroacetic acid)、2% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

6) 5% TCA 溶液

5% TCA、2% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

7) ガラスフィルター

Glass Microfiber filters GF/C 2.5 (Whatman)

8) 吸引濾過器

1225 サンプリングマニホールド (millipore)

3.2 測定方法

卵抽出液 (ULSS) に 1/20 容量の 6 mM CaCl_2 を添加し 23℃ で 15 分間インキュベートすることで間期抽出液とした。この間期抽出液と 1/40 容量の e.r.、1/40 容量の CHX、精子核 DNA 100,000 本/ μl (終濃度 1,000 本/ μl) をよく混和し、23℃ で 35 分間インキュ

ベートした。この反応液と p21、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ をよく混和し、あらかじめ各種組換えタンパク質を入れておいたエッペンドルフチューブに加え全量を 15 μl にした。

この反応液をよく混和してから 23°C でインキュベートし、反応後 1 サンプルあたり 160 μl の Proteinase K を含む Stop C を加えて DNA 複製反応を停止し、37°C で 30 分以上インキュベートしてタンパク質を分解させた。これに 10% TCA 溶液を 4 ml 加え、4°C で 30 分以上放置して DNA を沈殿させた。反応液を良く攪拌してから濾紙に 40 μl スポットし、ヒートランプで乾燥させた。残りの反応液はガラスフィルターを用いて濾過し、10% TCA 溶液、5% TCA 溶液、エタノールで順に洗浄し、濾紙と同様にヒートランプで乾燥させた。乾燥後にこれらを 1 ml の純水の入ったチューブに入れ放射活性を測定した。チェレンコフ光による ^{32}P 放射活性測定は液体シンチレーションカウンターを用い、 ^3H レンジで 1 分間計測した。濾紙からは全体の 1% の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ の放射活性が測定でき、ガラスフィルターからは DNA に取り込まれた $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ の放射活性が測定できる。これらをもとに DNA 合成量を算出した。

$$\text{DNA 合成量 (ng/}\mu\text{l)} = \frac{\text{ガラスフィルターの放射活性}}{\text{濾紙の放射活性}} \times 0.654$$

第 4 節 クロマチン結合の検出

4.1 材料と試薬

- 1) e.r. (3.1 参照)
- 2) CHX (3.1 参照)
- 3) TNIBA

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、2 mM MgCl_2 、2 mM DTT、0.5 mM spermidine、0.15 mM spermine、10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A (ペプチド研究所)、10 $\mu\text{g/ml}$

leupeptin (ペプチド研究所)、2.5 mM ATP、0.1% TritonX-100

4) 15% sucrose-TNIBA

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、2 mM MgCl₂、2 mM DTT、0.5 mM

spermidine、0.15 mM spermine、10 µg/ml pepstatin A (ペプチド研究所)、10 µg/ml

leupeptin (ペプチド研究所)、2.5 mM ATP、0.1% TritonX-100、15% sucrose

5) 遠心機

小型高速遠心機 TOMY MX-300、ローターTOMY TMS-21 (swing)

KUBOTA 3700、ローターAF-2018 (angle)

6) Tris-Glycine 系 SDS-PAGE に必要な試薬

i) 電気泳動ゲル

	stacking	separating gels				
	gel	5%	7%	8%	10%	15%
solution 1 (ml)	0.3	1.0	1.4	1.6	2.0	3.0
solution 2 (ml)	-	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
solution 3 (ml)	1	-	-	-	-	-
純水 (ml)	0.8	2.0	1.6	1.4	1.0	0
10% APS (µl)	15	20	20	20	20	20
TEMED (µl)	5	10	10	10	10	10

ii) solution 1

29.2% acrylamide、0.8% N,N'-methylenebisacrylamide

iii) solution 2

9.1% Tris-HCl (pH 8.8)、0.2% SDS

iv) solution 3

3% Tris-HCl (pH 6.8)、0.2% SDS

v) running buffer

0.1% SDS、0.3% Tris、1.44% Glycine

7) PVDF membrane

Immuno-Blot™PVDF Membrane for Protein Blotting (0.2 mm) (Bio-Rad)

8) transfer buffer

20% メタノール、80% Tris-Glycine 系 SDS-PAGE running buffer

9) ブロッティング装置

TE 22 Tank Transfer Unit (Amersham Biosciences)

10) ブロッキング溶液

0.5% skimmilk、0.05% Tween-PBS

11) 一次抗体溶液

抗 RPA p30 抗体は、山口大学大学院医学系研究科 室伏博士より恵与されたものを使用した。

抗 Cdc45 抗体は、大阪大学大学院理学研究科 滝澤博士より恵与されたものを使用した。

抗 H3 抗体は Abcam 社のものを使用した。

12) 二次抗体溶液

HRP-conjugated anti-Rabbit IgG antibody (Cell Signaling Tech) を使用した。

1% skimmilk -0.05% Tween-PBS で希釈した。

13) ウェスタンブロッティング検出用化学発光試薬

ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham)

ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham)

14) X線フィルム

KONICA X-RAY FILM (Konica)

4.2 クロマチン画分の単離

卵抽出液 (ULSS) に 1/20 容量の 6 mM CaCl_2 を添加し 23°C で 15 分間インキュベートすることで間期抽出液とした。この間期抽出液と 1/40 容量の e.r.、1/40 容量の CHX、精子核 DNA (終濃度 1,000 本/ μl) をよく混和し、23°C で 35 分間インキュベートした。この反応液に p21 を加えたものを、あらかじめ各種組換えたんぱく質や aphidicolin を入れておいたエッペンドルフチューブに加え全量を 14 μl にした。

この反応液をよく混和してから 23°C でインキュベートし、反応後 TNIBA 1 ml を加えて転倒混和した。混和液の下に 15% sucrose-TNIBA 100 μl を重層して swing rotor で遠心分離した (10,000 rpm、4°C、5 min)。界面まで上清を除いた後、さらに TNIBA を 1 ml 添加し angle rotor で遠心分離した (14,000 rpm、4°C、5 min)。上清を完全に取り除き、沈殿しているクロマチン画分に sample buffer を加えボルテックスし、100°C で 5 分間加熱して western blotting 用サンプルとした。

4.3 ウェスタンブロット法

western blotting 用サンプルを separating gel に 10% あるいは 15% polyacrylamide を含む Tris-Glycine 系電気泳動ゲルにアプライし、running buffer を用いて定電流 (1 枚あたり 20 mA) で泳動した。ブロット装置を用いて定電圧で PVDF membrane に分離したタンパク質を転写した (30 V、6hr)。その際 PVDF membrane はあらかじめメタノールと transfer buffer に浸し親水化しておいた。

転写後 membrane をブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間振盪することでブロッキングをおこなった。0.05% Tween-PBS で洗浄後一次抗体溶液に浸し室温で 1 時間振盪した。0.05% Tween-PBS で洗浄後、二次抗体溶液に浸し室温で 1 時間振盪した。

0.05% Tween-PBS、PBS で順に洗浄後、各抗体の力価に合った化学発光試薬を用いて X 線フィルムに造影し、現像液、停止液、定着液の順に浸して現像した。

第5節 免疫除去

5.1 材料と試薬

1) rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences)

2) 各種抗血清

3) ナイロンメンブラン

30 μ m NYLON NET FILTERS NY30 (Millipore)

4) LFB2/50

40 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、20mM K-Pi (pH 8.0)、1 mM EGTA、10% sucrose、
50 mM KCl、2 mM DTT、2 mM MgCl₂、1 μ g/ml pepstatin A (ペプチド研究所)、1
 μ g/ml leupeptin (ペプチド研究所)、2.5 mM ATP

5) e.r. (3.1 参照)

6) CHX (3.1 参照)

7) 遠心機

小型高速遠心機 TOMY MX-300、ローターTOMY TMS-21

5.2 方法

rProtein A Sepharose を純水で1回洗浄した後、100 mM HEPES-KOH (pH 8.0) で3回洗浄した。Sepharose (gel-bed) の3倍量の免疫前血清、もしくは免疫後の抗血清を加え、血清の1/10容量の1 M HEPES-KOH (pH 8.0) を加えてpHを保ち、1時間室温で転倒混和するか4°Cで終夜転倒混和した。抗体を結合させた Sepharose を100 mM HEPES-KOH (pH 8.0) で3回洗浄した後、LFB2/50 で4回洗浄した。ナイロンメンブランで遠心濾過 (3,000 rpm、4°C、2 min) して上清をできる限り除き、逆向きに遠心することで Sepharose を回収した。Sepharose (gel-bed) と等量の間期抽出液と1/20容量のCHXを加え4°Cで1時間転倒混和した。ナイロンメンブランで遠心濾過 (3,000 rpm、4°C、2 min) をおこない、濾液を免疫除去した卵抽出液とした。反応の際にはこれに1/20容量のe.r.

を加えて使用した。

第6節 Chk1 のリン酸化の検出

6.1 材料と試薬

1) e.r. (3.1 参照)

2) CHX (3.1 参照)

3) intact nuclei isolate buffer

50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂、1 µg/ml pepstatin A (ペプチド研究所)、1 µg/ml leupeptin (ペプチド研究所)、40% sucrose

4) LFB2/50

40 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、20mM K-Pi (pH 8.0)、1 mM EGTA、10% sucrose、50 mM KCl、2 mM DTT、2 mM MgCl₂、1 µg/ml pepstatin A (ペプチド研究所)、1 µg/ml leupeptin (ペプチド研究所)、2.5 mM ATP

4) 遠心機

小型高速遠心機 TOMY MX-300、ローターTOMY TMS-21

5) Tris-Glycine 系 SDS-PAGE に必要な試薬 (4.1 参照)

6) ブロッティング装置に必要な試薬と用具 (4.1 参照)

7) ブロッキング溶液

2% BSA、0.05% Tween-PBS

8) 一次抗体溶液

抗 phospho-Chk1 (Ser345) 抗体 (Cell Signaling Technology) を 3% BSA-0.1% NaN₃-0.05% Tween-PBS で 1,000 倍に希釈して使用した。

9) 二次抗体溶液

HRP-conjugated anti-Rabbit IgG antibody (Cell Signaling Tech) を 1% skimmilk

-0.05% Tween-PBS で 3,000 倍に希釈した。

13) ウェスタンブロッティング検出用化学発光試薬

ECLTM Western Blotting Detection Reagents (Amersham)

14) X 線フィルム

KONICA X-RAY FIRM (Konica)

6.2 方法

卵抽出液 (ULSS) に 1/20 容量の 6 mM CaCl₂ を添加し 23°C で 15 分間インキュベートすることで間期抽出液とした。この間期抽出液と 1/40 容量の e.r.、1/40 容量の CHX、精子核 DNA (終濃度 1,000 本/μl) を混和し、23°C で 35 分間インキュベートした。この反応液に p21 を加えたものを、あらかじめ各種組換えタンパク質や caffeine (終濃度 5 mM)、aphidicolin (終濃度 40 μg/ml) を入れておいたエッペンドルフチューブに加え全量を 36 μl にした。

この反応液をよく混和してからさらに 30 分間インキュベートし、反応後 intact nuclei isolate buffer 300 μl を加えて転倒混和し swing rotor で遠心分離した (5,000 ×g、4°C、5 min)。半分ほど上清を取り除いた後、さらに intact nuclei isolate buffer を 500 μl 加え swing rotor で遠心分離した (5,000 ×g、4°C、5 min)。10 μl 程度残して上清を除き、沈殿物に 5×sample buffer を加えて混和し、100°C で 5 分間加熱して western blotting 用サンプルとした。western blotting は 4.3 と同様の方法でおこなったが、一次抗体に関しては 4°C で終夜反応させた。

第 7 節 ライセンス化活性の測定

7.1 材料と試薬

1) e.r. (3.1 参照)

2) CHX (3.1 参照)

3) 20 mg/ml Proteinase K 溶液

20 mg/ml Proteinase K (MERCK)、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、50% (v/v) glycerol

4) Stop C

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EGTA、0.5% SDS

5) 10% TCA 溶液

10% TCA (trichloroacetic acid)、2% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

6) 5% TCA 溶液

5% TCA、2% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

7) ガラスフィルター

Glass Microfiber filters GF/C 2.5 (Whatman)

8) 吸引濾過器

1225 サンプリングマニホールド (millipore)

7.2 方法

目的のタンパク質を免疫除去した卵抽出液または緩衝液に目的のタンパク質と精子核 DNA (終濃度 1,000 本/ μl) を加えよく混和後、23°C でインキュベートした。その後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 、e.r.、CHX、geminin を含む 6 倍量の卵抽出液と混合し、さらに 23°C で 90 分間インキュベートした。DNA の合成量は 3.2 と同様の方法で測定した。

第 8 節 アルカリアガロースゲル電気泳動法

8.1 材料と試薬

1) e.r. (3.1 参照)

2) CHX (3.1 参照)

3) biotin-16-dUTP

Biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate 50 nmol (Roche) を 50 倍に希釈して使

用した。

4) T⁺LFB2/50

40 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、20mM K-Pi (pH 8.0)、1 mM EGTA、10% sucrose、
50 mM KCl、2 mM DTT、2 mM MgCl₂、1 µg/ml pepstatin A (ペプチド研究所)、1
µg/ml leupeptin (ペプチド研究所)、2.5 mM ATP、0.01% Triton

5) Stop N

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EGTA、0.5% SDS、200 mM NaCl

6) 20 mg/ml Proteinase K 溶液

20 mg/ml Proteinase K (MERCK)、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50% (v/v) glycerol

7) alkali agarose gel

1% SeaKem GTG Agarose (Lonza)、50 mM NaOH、1 mM EDTA

8) electrophoresis solution

50 mM NaOH、1 mM EDTA

9) denaturation solution

1.25 M NaOH、1.5 M NaCl

10) 6×alkali loading buffer

300 mM NaOH、6 mM EDTA、18% Ficoll、0.15% bromocresol green、0.25% xylene
cyanol FF

11) 20×SSC

3 M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム

12) low melting agarose

1% NuSieve GTG Agarose (CAMBREX)

13) membrane

HybondTM-N⁺ (Amersham)

14) Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo SCIENTIFIC)

15) バキュームブロッター

VacuGene XL (Pharmacia)

16) X 線フィルム

KONICA X-RAY FIRM (Konica)

8.2 方法

卵抽出液 (ULSS) に 1/20 容量の 6 mM CaCl_2 を添加し 23°C で 15 分間インキュベートすることで間期抽出液とした。この間期抽出液と 1/40 容量の e.r.、1/40 容量の CHX、biotin-dUTP を混和し、あらかじめ各種組換えタンパク質や caffeine、精子核 DNA (終濃度 1,000 本/ μl) を入れておいたエッペンドルフチューブに加え全量を 5 μl にした。

この反応液をよく混和してから 23°C でインキュベートし、反応後 1 サンプル当たり 140 μl の Stop N を加えて DNA 複製反応を停止した。この時同時に 20 mg/ml Proteinase K 溶液 (終濃度 0.2 mg/ml) を加え 37°C で 60 分間インキュベートすることでタンパク質を分解させた。エタノール沈殿により DNA を回収した後、1.2×alkali loading buffer 10 μl に再懸濁し、アルカリアガロース用サンプルとした。

アルカリアガロース用サンプルを alkali agarose gel にアプライし、13 v/cm、4°C で終夜電気泳動した。電気泳動後、ウェルを low melting agarose で埋め、0.25 M HCl に浸し室温で 20 分間振盪することで DNA を切断した。ゲルを純水で洗浄後、denaturation solution に浸し室温でさらに 20 分間振盪した。その後、バキュームブロッターを用いて 0.4 M NaOH 中で Hybond- N^+ membrane に DNA を転写した (50 mbar、1 hr)。

転写後 membrane を 2×SSC に浸し室温で 10 分間振盪した後よく乾燥させ、UV で DNA を crosslink させた。その後、blocking buffer に浸し、室温で 15 分間振盪することでブロッキングをおこなった。blocking buffer に Stabilized streptavidin を加えさらに 15 分間振盪することで DNA 中に取り込まれた biotin-dUTP と結合させた。wash buffer で

洗浄後、substrate equilibration buffer に浸し室温で 5 分間振盪した。

化学発光試薬を用いて X 線フィルムに造影し、現像液、停止液、定着液の順に浸して現像した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、数々の御指導御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野教授 榎本 武美先生に謹んで御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、有益なる御助言を戴きました東北大学大学院薬学研究科生命機能解析学分野準教授 矢野 環先生に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導を戴きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野準教授 関 政幸先生に謹んで感謝致します。

本研究を進めるにあたり、終始有益なる御指導並びに御助言を戴きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野助教 多田 周右先生に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり多くの親切なる御指導並びに御助言を戴きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野 津山 崇博士に心より感謝致します。

最後になりましたが、研究のみならず多方面に渡り御助言、御協力を戴きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野 吉村 明先生をはじめ遺伝子薬学分野の皆様我心より感謝致します。皆様の更なる御活躍をお祈りし、これを謝辞と致します。

平成 22 年 2 月 22 日

牛田 磨理

参考文献

Aparicio, O.M., Weinstein, D.M., and Bell, S.P. (1997). Components and dynamics of DNA replication complex in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell* **91**, 59-69.

Bell, S.P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**, 128-134.

Blow, J.J., and Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 476-486.

Bruning, J.B., and Shamoo, Y. (2004). Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase- δ p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure* **12**, 2209–2219

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Gene Dev.* **19**, 1040-1052.

Chong, J.P., Mahbubani, H.M., Khoo, C.Y., and Blow, J.J. (1995). Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature* **375**, 418-421.

Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gottesman, M., and Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol. Cell.* **11**, 203-213.

Donovan, S., Harwood, J., Drury, L.S., and Diffley, J.F. (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5611-5616.

Duursma, A.M., and Agami, R. (2005). CDK-dependent stabilization of Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5611-5616.

Eissenberg, J.C., Ayyagari, R., Gomes, X.V., and Burgers, P.M. (1997). Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase δ and DNA polymerase ϵ . *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6367–6378

Elsasser, S., Chi, Y., Yang, P., and Campbell, J.L. (1999). Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3263-3277.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-847.

Ferenbach, A., Li, A., Brito-Martins, M., and Blow, J.J. (2005). Functional domains of the Xenopus replication licensing factor Cdt1. *Nucleic Acids Res.* **33**, 316-324.

Gilbert, D.M. (2001). Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* **294**, 96-100.

Grallert, B., and Sipiczki, M. (1991). Common genes and pathways in the regulation of the mitotic and meiotic cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet* **20**, 199-204.

Herbig, U., Marlar, C.A., and Fanning, E. (1999). The Cdc6 nucleotide-binding site regulates its activity in DNA replication in human cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2631-2645.

Hofmann, J.F., and Beach, D. (1994). Cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *EMBO J.* **13**, 425-434.

Hua, X.H., and Newport, J. (1998). Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and Cdc6, but dependent on cdk2. *J. Cell Biol.* **140**, 271-281.

Khayrutdinov, B.I., Bae, W.J., Yun, Y.M., Lee, J.H., Tsuyama, T., Kim, J.J., Hwang, E., Ryu, K.S., Cheong, H.K., Cheong, C., Ko, J.S., Enomoto, T., Karplus, P.A., Güntert, P., Tada, S., Jeon, Y.H., and Cho, Y. (2009). Structure of the Cdt1 C-terminal domain: Conservation of the winged helix fold in replication licensing factors. *Protein Sci.* **18**, 2252-2264.

Labib, K., Diffley, J.F., and Kearsey, S.E. (1999). G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol.* **1**, 415-422.

Labib, K., Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* **288**, 1643-1647.

Lee, C., Hong, B., Choi, J.M., Kim, Y., Watanabe, S., Ishimi, Y., Enomoto, T., Tada, S., Kim, Y., and Cho, Y. (2004). Structural basis for inhibition of the replication licensing factor Cdt1 by geminin. *Nature* **430**, 913-917.

Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M.R., Kihara, M., Sugino, A., and Tye, B.K. (1997). Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev.* **11**, 3365-3374.

Li, A., and Blow, J.J. (2005). Cdt1 downregulation by proteolysis and geminin inhibition prevents DNA re-replication in *Xenopus*. *EMBO J.* **24**, 395-404.

Lisziewicz, J., Godany, A., Agoston, D.V., and Kuntzel, H. (1988). Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC6 gene. *Nucleic Acids Res.* **16**, 11507-11520.

Lohka, M.J., and Masui, Y. (1983). Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* **220**, 719-721.

Maine, G.T., Sinha, P., and Tye, B.K. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics*. **106**, 365-385.

Maiorano, D., Moreau, J., and Mechali, M. (2000). XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* **404**, 622-625.

Maiorano, D., Rul, W., and Mechali, M. (2004). Cell cycle regulation of the licensing activity of Cdt1 in *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.* **295**, 138-149.

McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043-1053.

Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J., and Helin, K. (2004). Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J. Cell Biol.* **165**, 473-482.

Moyer, S.E., Lewis, P.W., and Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10236-10241.

Nishitani, H., and Nurse, P. (1995) P65^{cdc18} plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell* **83**, 397-405.

Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**, 625-628.

Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 617-656.

O'Neill, T., Giarratani, L., Chen, P., Iyer, L., Lee, C.H., Bobiak, M., Kanai, F., Zhou, B.B., Chung, J.H., and Rathbun, G.A. (2002). Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J. Biol. Chem.* **277**, 16102-16115.

Rowles, A., Tada, S., and Blow, J.J. (1999). Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J. Cell Sci.* **112**, 2011-2018.

Saha, P., Chen, J., Thome, K.C., Lawlis, S.J., Hou, Z.H., Hendricks, M., Parvin, J.D., and Dutta, A. (1998). Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2758-2767.

Sato, N., Arai, K., and masai, H., (1997). Human and *Xenopus* cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7. *EMBO J.* **16**, 4340-4351.

Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749-1753.

Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**, 247-258.

Speck, C., Chen, Z., Li, H., and Stillman, B. (2005). ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 965-971.

Tada, S., Chong, J.P., Mahbubani, H.M., and Blow, J.J. (1999). The RLF-B component of the replication licensing system is distinct from Cdc6 and functions after Cdc6 binds to chromatin. *Curr. Biol.* **9**, 211-214.

Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M., and Blow, J.J. (2001). Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol.* **3**, 107-113

Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. (1997). Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell.* **90**, 649-660.

Teer, J.K., and Dutta, A. (2008). Human Cdt1 lacking the evolutionarily conserved region that interacts with MCM2-7 is capable of inducing re-replication. *J. Biol. Chem.* **283**, 6817-6825.

Tsuyama, T., Tada, S., Watanabe, S., Seki, M., and Enomoto, T. (2005). Licensing for DNA replication requires a strict sequential assembly of Cdc6 and Cdt1 onto chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res.* **33**, 765-775.

Tsuyama, T., Watanabe, S., Aoki, A., Cho, Y., Seki, M., Enomoto, T., and Tada, S. (2009). Repression of nascent strand elongation by deregulated Cdt1 during DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell.* **20**, 937-947.

Vas, A., Mok, W., and Leatherwood, J. (2001). Control of DNA replication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5767-5777.

Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D.S., and Dutta, A. (2003). A p53-Dependent Checkpoint Pathway Prevents Rereplication. *Mol. Cell* **11**, 997-1008

Wang, B., Feng, L., Hu, Y., Huang, S.H., Reynolds, C.P., Wu, L., and Jong, A.Y., (1999). The

essential role of *Saccharomyces cerevisiae* CDC6 nucleotide-binding site in cell growth, DNA synthesis, and Orc1 association. *J. Biol. Chem.* **274**, 8291-8298.

Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z., and Hanaoka, F. (2002). Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 40871-40880.

You, Z., and Masai, H. (2008). Cdt1 forms a complex with the minichromosome maintenance protein (MCM) and activates its helicase activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 24469-24477.

Zhu, W., Chen, Y., and Dutta, A. (2004). Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7140-7150.